

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462227

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による神経保護作用と神経障害性疼痛の改善効果

研究課題名(英文) Low-energy extracorporeal shock wave therapy for improvement of locomotor and sensory functions after spinal cord injury

研究代表者

小澤 浩司(OZAWA, Hiroshi)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10312563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用い損傷脊髄に体外低出力衝撃波を照射することにより、VEGFを中心とした血管増殖因子や神経栄養因子が産生され、損傷脊髄の二次傷害を防ぎ、神経の回復が促されるか検討した。その結果、体外低出力衝撃波治療により、血管新生因子であるVEGFと受容体Flt-1、神経栄養因子であるBDNFと受容体TrkBが早期に上昇することがみとめられた。さらに運動機能と知覚機能の有意な改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) increases expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured endothelial cells. We investigated the cell specificity of VEGF expression in injured spinal cords and angiogenesis induced by low-energy ESWT, and examined the neuroprotective effects of low-energy ESWT on cell death, axonal damage, and white matter sparing as well as the therapeutic effect for improvement of sensory function following spinal cord injury (SCI). The results of this study suggested that low-energy ESWT promotes VEGF expression in various neural cells and enhances angiogenesis in damaged neural tissue after SCI. Furthermore, the neuroprotective effect of VEGF induced by low-energy ESWT can suppress cell death and axonal damage and consequently improve locomotor and sensory functions after SCI. Thus, low-energy ESWT can be a novel therapeutic strategy for treatment of SCI.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 体外低出力衝撃波 治療

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の脊髄障害は、直接的外力（一次傷害）によって生じる脊髄組織の挫傷、出血性壊死と、その後の虚血、生化学的变化、病理学的変化（二次傷害）によって生じるアポトーシスを含む遅発性の細胞死により引き起こされる。我々はこれまで二次的傷害に着目し、その病態の解明や新たな治療の開発のために数々の研究を行ってきた。下川らは低出力の衝撃波を用いた体外衝撃波治療により、ブタ慢性心筋梗塞モデル、ブタ急性心筋梗塞モデル、ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて、虚血組織における毛細血管数および血流の有意な増加と VEGF など様々なサイトカインの産生により心筋血流の改善、心機能の改善、下肢血流の改善を認めたと報告した (Shimokawa et al, Circulation 2004, Coron Artery Dis 2007, Tohoku J Exp Med 2008)。現在、この治療法は心筋梗塞後や下肢閉塞性動脈硬化症の治療に先進医療として認められ臨床応用されている。近年、VEGF は血管増殖因子だけでなく神経増殖因子、神経栄養因子、神経保護因子としての働きが複数報告され注目されている。(David et al, Nature 2005) (Omolara et al, The Journal of Biological Chemistry 2002) (Erik et al, BioEssays 2004) (Hyuk et al, PLoS ONE 2009)

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット脊髄損傷モデルにおいて、低出力体外衝撃波によって VEGF が発現する細胞を組織学的に評価し、血管新生や細胞死などのメカニズムを検討する。また、運動機能のみならず、アロディニアを改善するか検討する。

3. 研究の方法

60 匹のラットを以下の 2 群に分けた：SCI 群（椎弓切除後に脊髄損傷を作製）、SCI-SW 群（脊髄損傷後に低出力衝撃波を照射）。重錘落下式脊髄損傷作製装置 New York University Impactor で第 10 胸椎レベルに脊髄損傷モデルを作製した。低出力衝撃波を損傷部の皮膚上から週 3 回、3 週間照射した。運動機能評価として、損傷後 42 日間の運動機能を BBB score (Basso, Beattie and Bresnahan score) を用いて評価した。知覚機能の評価として、損傷後 42 日間のアロディニアを von Frey test, Hargreaves test で評価した。損傷後 7 日目の脊髄組織で各神経系細胞マーカー NeuN, GFAP, Olig2 と VEGF の二重染色を行い、VEGF 発現の局在を調べた。損傷後 42 日目の脊髄組織を用い CD31 染色、SMA 染色で新生血管数を、5-HT 染色で残存軸索を評価した。損傷後 42 日目の Luxol fast blue 染色を行い、残存白質面積を比較した。さらに TUNEL 染色で細胞死を評価した。

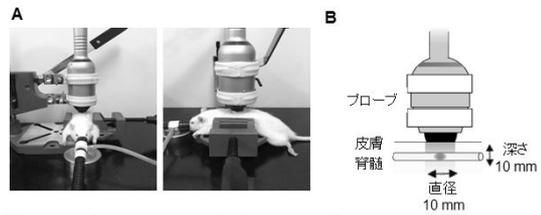


図 1. 低出力体外衝撃波の照射
A 第 8 と第 12 胸椎棘突起間の脊髄直上に経皮的に衝撃波用プローブを設置した。
B 衝撃波が有効な焦点距離は直径 10 mm, 深さ約 10 mm である。

4. 研究成果

SCI-SW 群では SCI 群に比べ、損傷後 14 日目、35 日目、42 日目の運動機能が有意に高かった。

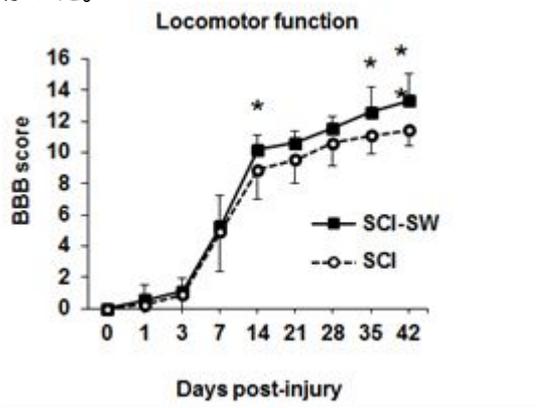


図 2. 脊髄損傷後運動機能評価 BBB score
SCI 群と SCI-SW 群の BBB score は、損傷後 1 日目から徐々に増加し、14 日目以降は緩やかになった。損傷後 14 日目、35 日目、42 日目では、SCI-SW 群は SCI 群よりも有意に運動機能が改善した。The values are mean ± SD (*p < 0.05, **p < 0.01).

von Frey test では、SCI 群に比べ、SCI-SW 群で損傷後 28 日目、35 日目の疼痛閾値が有意に高かった。Hargreaves' test では、損傷後 35 日目、42 日目で、SCI-SW 群は SCI 群よりも有意に逃避潜時が改善していた。

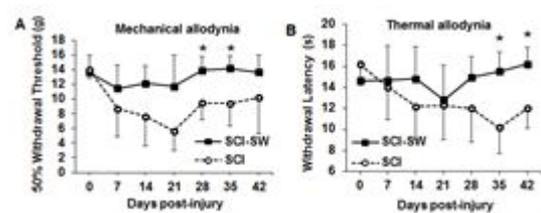


図 3. 機械的、熱的アロディニアの評価

A: von Frey test では、損傷後 7 日目から SCI-SW 群の疼痛閾値が高い傾向にあり、損傷後 28 日目、35 日目では有意差がみられた。

B: Hargreaves' test では、損傷後 28 日目以降で SCI-SW 群の逃避潜時が高い傾向にあり、損傷後 35 日目、42 日目では、SCI-SW 群は SCI 群よりも有意に改善していた。The values are mean ± SD (*p < 0.05).

二重染色では NeuN、GFAP、Olig2 陽性細胞の全てで VEGF が発現していた。損傷後 42 日目の CD31 陽性細胞、SMA 陽性細胞は SCI-SW 群で有意に多かった。損傷後 42 日目の残存白質面積は、SCI-SW 群で多い傾向にあったが、有意な差はなかった。TUNEL 陽性細胞数は、SCI-SW 群が有意に少なかった。

本研究から、脊髄損傷に対する ESWT によって、様々な神経系細胞から VEGF が発現し、血管新生が促進することが明らかになった。VEGF の神経保護作用が、細胞死を抑制し、残存軸索を増加させ、運動機能とアロディニアを改善すると考えられた。低出力体外衝撃波治療は脊髄損傷の有効な治療法となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yamaya S, Ozawa H, Kanno H, Kishimoto KN, Sekiguchi A, Tateda S, Yahata K, Ito K, Shimokawa H, Itoi E. Low-energy extracorporeal shock wave therapy promotes vascular endothelial growth factor expression and improves locomotor recovery after spinal cord injury. J Neurosurg.、査読有、121、2014、1514-1525
DOI: 10.3171/2014.8.JNS132562

Yahata K, Kanno H, Ozawa H, Yamaya S, Tateda S, Ito K, Shimokawa H, Itoi E. Low-energy extracorporeal shock wave therapy for promotion of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis and improvement of locomotor and sensory functions after spinal cord injury. J Neurosurg Spine. 査読有、25、2016、745-755
DOI: 10.3171/2016.4.SPINE15923

[学会発表](計8件)

八幡 健一郎, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 山屋 誠司, 舘田 聡, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷における低出力体外衝撃波治療による神経保護作用と運動機能改善効果. 第 43 日本脊椎脊髄病学会、2014 年 4 月 17-19 日、京都国際会議場(京都府、京都市)

八幡 健一郎, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 山屋 誠司, 舘田 聡, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による VEGF 発現と神経保護作用の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 8-9 日、城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)

八幡 健一郎, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 山屋 誠司, 舘田 聡, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による血管新生の促進と脊髄障害の改善効果. 第 44 日本脊椎脊髄病学会、2015 年 4 月 16-18 日、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

八幡 健一郎, 小澤 浩司, 菅野 晴夫, 山屋 誠司, 舘田 聡, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による VEGF 発現・血管新生の促進と運動・知覚機能の改善効果. 第 88 回日本整形外科学会学術総会、2015 年 5 月 21-24 日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

八幡 健一郎, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 山屋 誠司, 舘田 聡, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による血管新生の促進と軸索障害の抑制. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 22-23 日、富山国際会議場(富山県、富山市)

八幡 健一郎, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 山屋 誠司, 舘田 聡, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による血管新生の促進と軸索障害の抑制. 第 45 日本脊椎脊髄病学会、2016 年 4 月 14-16 日、幕張メッセ(千葉県、千葉市)

舘田 聡, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 山屋 誠司, 八幡 健一郎, 山本 裕明, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療 プタ脊椎を用いた椎弓切除前後の衝撃波伝達の比較. 第 45 日本脊椎脊髄病学会、2016 年 4 月 14-16 日、幕張メッセ(千葉県、千葉市)

八幡 健一郎, 菅野 晴夫, 小澤 浩司, 舘田 聡, 松田 倫治, 菅谷 岳広, 山本 裕明, 伊藤 健太, 下川 宏明, 井樋 栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療における椎弓切除の意義 プタ脊椎を用いた脊柱管内における衝撃波の解析. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 13-14 日、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 浩司 (OZAWA, Hiroshi)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号: 10312563

(2)研究分担者

菅野 晴夫 (KANN0, Haruo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40646808

伊藤 健太 (ITO, Kenta)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50375086